



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Evaluación de anomalías externas y esqueléticas en los fetos descendientes de ratones hembra de la cepa CD-1 tratadas en el día 7 de preñez con acetato de talio ( $\text{CH}_3\text{COOTl}$ ).**

**Tesis**

**Que para obtener el título de**

**Bióloga**

**Presenta**

**Yazmín Vázquez Martínez**

**Directora: Dra. Lucila Álvarez Barrera**

**Asesor: Dr. Juan José Rodríguez Mercado**

**MÉXICO  
CD.MX.**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. Introducción.....	2
1.1 Talio.....	2
1.2 Usos del talio.....	3
1.3 Fuentes de emisión.....	5
1.4 Toxicidad de talio.....	6
1.5. Toxicidad de talio en reproducción y en el desarrollo.....	7
1.6 El ratón como modelo de experimentación en teratogénesis.....	12
1.7 Evaluación del esqueleto.....	13
II. Justificación.....	14
III. Hipótesis.....	15
IV. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos Particulares.....	15
V. Materiales y Métodos.....	16
5.1 Animales.....	16
5.2 Compuestos químicos.....	16
5.3 Tratamientos.....	16
5.4 Obtención de los fetos.....	17
5.5 Anormalidades externas.....	18
5.6 Anormalidades de hueso y cartílago - hueso.....	18

5.7 Fijación con solución de Bouin.....	18
5.8 Técnica de tinción para hueso (rojo de alizarina).....	18
5.9 Técnica de tinción de hueso y cartílago (rojo de alizarina y azul de alciano).....	18
5.10 Análisis del esqueleto .....	18
5.11 Análisis estadístico .....	19
VI. Resultados .....	19
6.1 Toxicidad materna.....	19
6.2 Toxicidad embrionaria y fetal.....	19
6.3 Revisión de las anomalías externas.....	20
6.4 Revisión del sistema esquelético .....	24
VII. Discusión .....	38
VIII. Conclusiones .....	45
IX. Referencias.....	46

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Lucila Álvarez Barrera y la asesoría del Dr. Juan José Rodríguez Mercado en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) L5 PA, UMIEZ. FES Zaragoza Campo II, UNAM. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo de la UNAM-DGAPA-PAPIIT, con los proyectos IA-201312 y IN-225216.

*“El planeta es un organismo.  
Todos nosotros somos células  
con propósitos diferentes...”*

## *Agradecimientos*

*A la Dra. Lucila Álvarez Barrera, por su enorme paciencia, confianza, sus enseñanzas, el apoyo durante este trayecto y por darme la oportunidad de pertenecer a tan extraordinario equipo de trabajo.*

*Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado, por su confianza y el apoyo brindado para la realización de este trabajo..*

*A los sinodales por el tiempo y atención dedicada a la revisión de la tesis.*

*A mis amigos y compañeros del laboratorio en especial a Karla, Iván, Adriana, Elizabeth, Julio, Jocelyn, Lilia, Angélica y Víctor por su apoyo y los gratos momentos compartidos, al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por ese gran espíritu profesional, orientación, enseñanzas y por brindarme su amistad, a la M. en C. Verónica Martínez Zarco por su apoyo y amabilidad en todo momento, a los doctores que conforman la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, por impulsarme siempre a mejorar así como también su asesoría en la realización de este trabajo y su buena disposición.*

## *Dedicatorias*

*A mis padres, Simón Vázquez Pérez y Lourdes Martínez Bacilio por ser los dos enormes pilares de mi vida, por su apoyo, desvelos y sacrificios para que yo pudiera llegar a cumplir cada una de mis metas, porque mis logros también son suyos, por la confianza brindada y el apoyo incondicional y porque sin duda alguna no podría tener mejores padres que ustedes... LOS AMO.*

*A mis hermanos Nallely Vázquez Martínez y Octavio Vázquez Martínez por su motivación, apoyo y cariño, porque a pesar de ir en diferentes direcciones tenemos una sola raíz y la vida de cada uno siempre será una parte esencial de la vida del otro... LOS QUIERO.*

*A los que ya no están conmigo pero siempre creyeron en mí, mis abuelos, Simón Vázquez Sánchez †, Rosenda Pérez Águila †, Francisco Martínez Ortiz † y Aurora Bacilio López †, por hacer de mi infancia una etapa extraordinaria, enseñarme el valor de la familia, el trabajo honesto y la perseverancia... LOS EXTRAÑO CADA DÍA.*

*A cada miembro de ambas familias, Vázquez Pérez y Martínez Bacilio, por el apoyo brindado en todo momento y los buenos momentos compartidos... GRACIAS.*

*A mis entrañables... por acompañarme en cada una de las lindas etapas de mi vida, por los extraordinarios momentos compartidos y el apoyo brindado en las dificultades, Alejandra Bazaldúa, Andrea Godínez, Ana Granillo, Carolina Cayetano, Eva Mota, Gema Campech, Lorena Ramírez, Isabel Castro, Itzel Campos, Miguel Arizmendi, Teresa López. ... GRACIAS POR ENSEÑARME A MIRAR CON OTROS OJOS.*



## *RESUMEN*

El talio y sus compuestos son considerados altamente peligrosos para los seres vivos. Debido a su similitud con los iones potasio ( $K^+$ ) las plantas y mamíferos lo absorben fácilmente, en los animales ingresa a través de la piel, por el tracto digestivo y respiratorio y, una vez absorbido es distribuido en todo el cuerpo, puede cruzar la barrera placentaria, hematoencefálica y hematogonadal, por lo que puede inducir neurotoxicidad, toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo. De hecho para los mamíferos cualquiera de sus formas químicas son tóxicas independientemente de la vía de administración. Este metal representa un riesgo para la población en general debido a la exposición diaria a través de diferentes vías, incluyendo la inhalación de aire, consumo de agua potable o alimentos contaminados, también la exposición a residuos industriales e hidrocarburos orgánicos y pesticidas. Para conocer los efectos sobre el desarrollo, embriotoxicidad y fetotoxicidad, en este trabajo se utilizó acetato de talio ( $CH_3COOTI$ ) administrado a ratones hembra preñadas de la cepa CD-1 de tres meses de edad. Se formaron 5 grupos (10 hembras por cada uno), tres de ellos tratados con  $CH_3COOTI$  (con 4.62, 9.25 y 18.5 mg/kg) y otro grupo testigo al cual se le administró agua inyectable, todos los tratamientos se dieron vía intraperitoneal el día 7 de gestación (dosis única) y las hembras se sacrificaron en el día 18 de gestación. No se observó toxicidad materna o toxicidad embrionaria y fetal en ninguno de los casos en los grupos tratados con  $CH_3COOTI$ . Las principales variaciones al evaluar la anatomía externa de los fetos consistieron en rotación de extremidades superiores e inferiores y al evaluar el sistema esquelético se observó osificación tardía en los huesos, principalmente de cabeza, esternón-costillas y extremidades inferiores. Los resultados encontrados en el presente trabajo muestran que el  $CH_3COOTI$  daña el proceso de osificación esquelética pero éste puede o no ser permanente por lo que no puede ser señalado como un agente teratogeno hasta realizar más estudios utilizando el mismo modelo de prueba y compuesto.

## *I. Introducción*

Los metales por su utilidad han contribuido al desarrollo tecnológico del hombre, no obstante, muchos de estos elementos se encuentran en concentraciones que no existían en el ambiente, lo que ha contribuido al deterioro de la calidad del aire y del agua propiciando su acumulación en suelos y en los alimentos (Peter y Viraraghavanb, 2005; Rodríguez-Mercado y Altamirano Lozano, 2013).

La exposición a concentraciones elevadas de compuestos metálicos, sobre todo a los no esenciales, afectan a los organismos a varios niveles debido a que la mayoría son tóxicos (Galanis *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2014) y los organismos muestran poca adaptabilidad o son incapaces de asimilar su presencia (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013). Por ejemplo, el plomo (Pb), mercurio (Hg) y el cadmio (Cd) pueden atravesar la barrera hematoencefálica y producir neurotoxicidad, otros como el galio (Ga), indio (In) y **talio** (Tl) son considerados altamente peligrosos por sus efectos nocivos sobre la salud (Yu *et al.*, 2011).

### *1.1 Talio*

El talio (Tl) forma parte del grupo IIIA de la tabla periódica, junto con el boro (B), el aluminio (Al), el galio (Ga) y el indio (In). Su nombre deriva del término griego Thallos, es decir, rama verde o joven. Fue aislado en 1861 por William Crookes y por el químico francés Claude Auguste Lamy, es un metal pesado de aspecto brillante, es de color gris azulado, dúctil y tiene una densidad de  $11.85 \text{ g/cm}^3$  (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Repetto y Del Peso, 2012).

Este metal no se encuentra puro en la naturaleza, está presente como elemento traza en algunos minerales como la crookesita  $[(\text{TlCuAg})_2\text{Se}]$ , orbaita  $(\text{TlAs}_2\text{SbS}_5)$ , lorandita  $(\text{TlAsS}_3)$ , feldespatos, micas, rocas volcánicas y se encuentra asociado principalmente con potasio y rubidio (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Repetto y Del Peso, 2012). Se estima que se libera al ambiente 5000 toneladas de talio por año, debido a la actividad industrial, como la combustión del carbón y la producción de cemento, en el año 2004 la producción alcanzó 12 Ton, sin

embargo, a principios del 2005 se mantiene un nivel relativamente estable de 10 Ton. por año (Karbowska, 2016).

El talio se encuentra en dos estados de oxidación,  $Tl^+$  y  $Tl^{3+}$ , ambos se consideran altamente tóxicos para los seres humanos y los organismos tanto domésticos como silvestres. La mayoría de las sales de este metal son incoloras, inodoras e insípidas, donde las más comerciales son el **acetato de talio**, carbonato de talio y sulfato de talio (con  $Tl^+$  y  $Tl^{3+}$ ) y el tricloruro de talio y sesquióxido de talio (con  $Tl^{3+}$ ) (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

En este trabajo se empleó el **acetato de talio** ( $C_2H_3O_2Tl$ ) que es una sal que forma cristales blancos, se descompone a alta temperatura, tiene un punto de fusión de  $131^\circ C$ , es muy soluble en agua fría, soluble en alcohol, muy soluble en cloroformo e insoluble en acetona, cuya dosis letal ( $DL_{50}$ ) en ratones es de 37 mg/kg por vía intraperitoneal (ip) (Repetto y Del Peso, 2012).

### *1.2 Usos del talio*

El Tl tiene actualmente varios usos, como se muestra en el **Cuadro I**, en la industria de la fabricación de lentes y componentes ópticos de espectrofotómetros, hechos de cristales de bromoyoduro de talio y como un catalizador de diversos procesos químicos industriales. También es empleado en la fabricación de celdas fotoeléctricas con oxisulfuro de talio, contadores de centelleo, fuegos artificiales, joyería de imitación, semiconductores, instrumentos infrarrojos, rodenticidas, productos de la industria de vidrio, vidrio óptico, así como en una aleación de talio y mercurio en termómetros de baja temperatura; en medicina como un radioisótopo ( $^{201}Tl$ ) para imágenes de tumores y del miocardio, en tratamientos depilatorios y pigmento para cosméticos (Tsai *et al.*, 2006; Repetto y Del Peso, 2012; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

**Cuadro I. Usos del talio y sus compuestos.**

Usos	Compuestos de Tl
<b>Aleaciones</b>	
Resistentes a los ácidos, resistentes a la corrosión, y aleaciones antifricción.	Varios compuestos de talio
Aleaciones de electrodos.	
Aleaciones para termómetros de baja temperatura.	
<b>Biología y medicina</b>	
Diagnóstico de melanomas	$^{201}\text{Tl}$
Centellografía de imágenes del corazón, el hígado, la tiroides y los testículos.	
<b>Eléctricos y electrónicos</b>	
Añadido a las lámparas de mercurio	Haluros de Tl
Lentes, placas y prismas en los sistemas espectroscópicos ópticos.	TlBr y TlI
Fabricación de fotocélulas eléctricamente sensibles.	Tl <sub>2</sub> S y Tl; haluro
Fabricación de la fibra de vidrio (óptico) con una preparación de alto índice de refracción de vidrio negro o marrón opaca.	Tl <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> TlBr, TlI, y
El vidrio impregnado con Tl se utiliza como recubrimientos protectores sobre los semiconductores, condensadores y otros dispositivos electrónicos.	Tl <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , selenito de Tl, y otros compuestos
Para detectar la radiación infrarroja.	Oxisulfurode Tl
<b>Productos farmacéuticos</b>	
Cosméticos y productos depilatorios para tratar las infecciones fúngicas del cuero cabelludo.	CH <sub>3</sub> COOTl y Tl <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Otras aplicaciones industriales</b>	
Catalizador en la oxidación, reducción, aromatización esterificación y polimerización de las moléculas orgánicas.	CH <sub>3</sub> COOTl, TlNO <sub>3</sub> , y otras sales
Fuegos artificiales.	TlNO <sub>3</sub>
Fabricación de plaguicidas.	Tl <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> y Tl <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Pigmentos y colorantes.	Cromato de Tl (Tl <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> )
La producción de joyas de imitación y los diamantes artificiales.	Tl <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> y Tl óxidos
La producción de fertilizantes de fosfato y otros fertilizantes.	No hay datos
Síntesis del amoniaco, la cloración de hidrocarburos, y varias reacciones de oxidación-reducción.	TlCl, óxidos de Tl, y otras sales

Tomado y modificado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013.

### *1.3 Fuentes de emisión*

Diversas industrias liberan TI al ambiente. Por ejemplo, durante la producción de energía eléctrica, plantas cementeras y procesos de refinación son fuentes que emiten polvos y humos con TI, contaminando la superficie del suelo, el aire y el agua de los lugares cercanos, por lo que, los alimentos provenientes de esas zonas tienen elevadas cantidades de este metal (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2013; Caserta *et al.*, 2013).

Lo anterior representa un riesgo para la población ya que pueden sufrir exposición diaria a TI a través del contacto con los residuos industriales, suelos contaminados, hidrocarburos orgánicos o pesticidas, a través de diferentes vías como la respiración, el tracto digestivo o la piel (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013; Caserta *et al.*, 2013).

El TI puede ser consumido en agua (menos de 1µg/L) y por alimentos provenientes del mar o terrestre de origen animal y vegetal. Por ejemplo, algunos peces como la tilapia dorada y la trucha de arroyo (*Salvelinusfontinalis*) contiene 800-8,600 y 3,000 µg de TI por kg de peso, respectivamente. En mariscos las partes blandas de moluscos o crustáceos y peces marinos contienen de 349-2,930 µg TI/kg de peso húmedo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

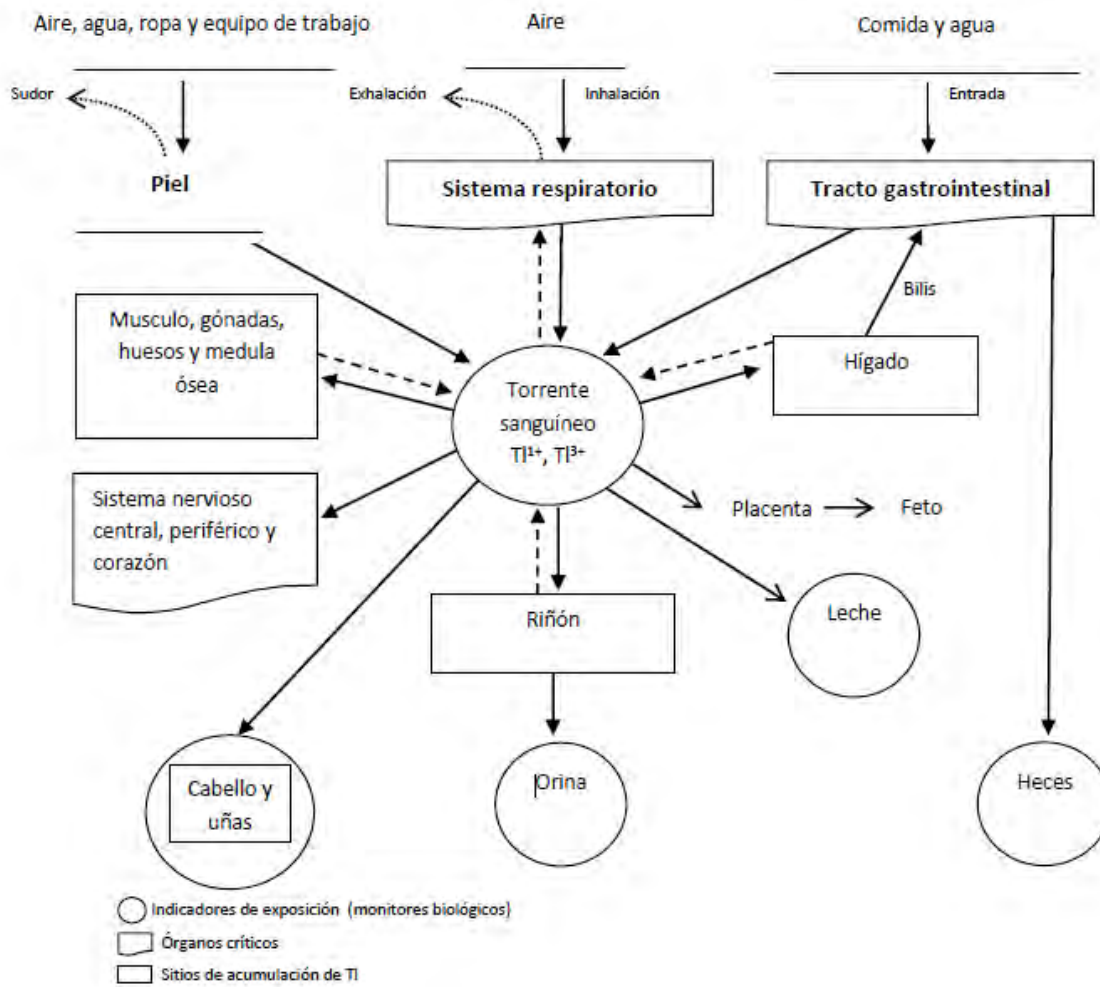
Los alimentos de origen animal como la carne de puerco contienen 1.7 µg TI/kg de peso seco, otras carnes rojas de 50 a 70 µg/kg y las aves de corral contienen 2.8 µg/TI/kg. La concentración de TI en la leche está entre 10 y 30 µg/kg. En el forraje destinado para la alimentación de animales se ha encontrado de 20-80 µg/kg, en tanto que la parte comestible de diversas verduras y cereales de 20-300 µg/kg y de 20-30 µg/kg en la papa. El TI también se encuentra en algunos productos de consumo como el tabaco, con niveles de 1.1-2.4 ng por cigarrillo, en vinos rojos y blancos de 40-480 µg/kg respectivamente (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

#### *1.4 Toxicidad de talio*

Este metal es considerado altamente peligroso para varias especies, cualquiera de sus compuestos independientemente de la vía de administración (Repetto y Del Peso, 2012). Reportes de personas que ingirieron grandes cantidades de talio durante un período corto de tiempo presentaban diversos síntomas, entre los que se encuentran vómito, diarrea, alopecia, líneas Mees en las uñas, así como también disestesia (pérdida o exageración de la sensibilidad), neuropatía dolorosa (el dolor puede ser espontáneo o inducido por estímulos normalmente no dolorosos, como el tacto), debilidad muscular (cansancio), parálisis de los nervios craneales, ataxia (dificultad de coordinación de movimientos), temblores, convulsiones, coma y en varios casos muerte. (Peter y Viraraghavanb, 2005; Tsai *et al.*, 2006; Karbowska, 2016).

La exposición de los seres humanos a una dosis de 3.4 mg/kg produce efectos adversos a la salud y cerca de 6 mg/kg suelen ser letales. Por lo anterior la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha informado que el Tl es más tóxico que otros metales tal como el Hg, Cd y Pb; por lo que algunos autores consideran que el Tl representa un elevado riesgo para la vida silvestre y en particular para los mamíferos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

Debido a su similitud con los iones potasio ( $K^+$ ) las plantas y mamíferos lo absorben fácilmente. Por ejemplo, en los animales ingresa a través de la piel, por el tracto digestivo y respiratorio (Galván-Arzate y Santamaría, 1998; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013; Karbowska, 2016). Una vez absorbido, es distribuido en todo el cuerpo, puede cruzar la barrera placentaria, hematoencefálica y hematogonadal, por lo que puede inducir neurotoxicidad, toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo (Figura 1) (Yu *et al.*, 2011; Caserta *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014).



**Figura1.** Muestra las rutas que sigue el talio desde su entrada al organismo, absorción y excreción (tomado y modificado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2013).

### 1.5. Toxicidad de talio en reproducción y en el desarrollo

La toxicidad de los metales puede alterar el funcionamiento del sistema reproductor, femenino y masculino (Caserta *et al.*, 2013). Trabajos *in vivo* mostraron que la exposición a diferentes compuestos de Tl puede producir efectos en los testículos y espermatozoides. La administración oral de sulfato de talio (270  $\mu\text{g}$  Tl/rata) a ratas Wistar macho durante 60 días, provocó desarreglo del epitelio tubular, cambios en las células de Sertoli, acumulación de talio en los testículos y reducción de la movilidad espermática (Formigli *et al.*, 1986), en tanto que, la

administración de carbonato de talio vía oral en ratones machos durante 6 meses, disminuyó la movilidad y la viabilidad espermática (Wei, 1987).

Por otra parte, la administración de sulfato de talio a cultivos mixtos, de células germinales y de Sertoli, en concentraciones de 35, 7 y 1.4,  $\mu\text{g}$  inhibe la capacidad de adhesión al sustrato de manera dependiente de la concentración y del tiempo (Gregotti *et al.*, 1992). Los autores concluyeron que este trabajo mostraba resultados comparables con los efectos *in vivo* de la toxicidad testicular en células germinales y de Sertoli.

En cuanto al sistema reproductor femenino la presencia de metales puede desarrollar patologías ginecológicas, que afecta desde la producción de gametos, fertilización y el desarrollo de la progenie (Caserta *et al.*, 2013), provocando defectos estructurales y funcionales al nacimiento “efectos teratogénicos”, ambas anomalías se refieren a cambios permanentes en el neonato que resulta de la exposición intrauterina (Wells *et al.*, 2005). Es por ello que el ambiente en el cual vive la madre tiene gran importancia en el buen término del desarrollo del producto (Altamirano-Lozano, 2006).

En el **Cuadro II**, se muestra la información de la toxicidad reproductiva del TI en murinos, también se pueden observar los efectos del talio en el desarrollo embrionario y perinatal, que son escasos, predominando los efectos sobre el sistema óseo. Como lo muestra el trabajo realizado por Hall en 1977, donde aplicaron 0.6 mg/huevo de sulfato de talio y encontraron reducción en el crecimiento de la tibia, angulación y necrosis de los condrocitos, concluyeron que el talio produce efecto en la matriz del cartílago de los huesos largos, debido a que disminuye la síntesis de glucosaminoglicanos y retarda la deposición en la matriz extracelular afectando el desarrollo del hueso (Hall, 1977).



**Cuadro II.** Toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo inducida por talio en rata y ratón.

Especie	Sexo y edad	Ruta	Dosis y duración	Efecto	Referencia
Rata 10/grupo	Machos adultos	Oral (en potable) agua	0.10 ppm de sulfato de talio (I). Durante 30 o 60 días.	Desarreglos del epitelio tubular del testículo, vacuolización citoplasmica, reducción de la movilidad espermática. Afecta las células de Sertoli y reducción de la actividad $\beta$ -glucorodinasa.	Formigli <i>et al.</i> , 1986.Gregotti <i>et al.</i> , 1985.
Ratón	Machos (edad no especificada)	Oral (en potable) agua	0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, y 10 mg/L de carbonato de talio (I) correspondiente a 0, 0.0003, 0.003, 0.03, 0.3, y 3mg/kg de TI por día. Por 6 meses.	Disminución de la movilidad y conteo espermático. Incremento de espermatozoides anormales.  Evaluación de la función reproductiva masculina con hembras no tratadas. Disminución de fetos vivos en las primeras tres concentraciones de carbonato de talio.	Wei 1987.
Rata	Hembra y macho en etapa perinatal	De madres a hijos (en potable) agua	0.1 mg/dL de sulfato de talio (I), del día 1 de gestación hasta el destete. Durante 60 días.	Cincuenta días después de la exposición prenatal y postnatal se observó retraso en el desarrollo y atrofia de los folículos pilosos.	Rossi <i>et al.</i> , 1988.
Rata	No especificado	(intraperitoneal)	16 mg/kg de acetato de talio (I) un día después del nacimiento.	En general presentan tamaño corporal pequeño, alopecia persistente, diarrea y atrofia muscular progresiva en ambos miembros posteriores.	Barroso- Moguel <i>et al.</i> , 1996.

Tomado y modificado de EPA US, 2009.

Ratas recién nacidas (24 h de edad) tratadas con una administración intraperitoneal de acetato de talio (32 mg/kg) y sacrificadas en diferentes tiempos presentaron síntomas como diarrea y alopecia, así como efectos sobre el desarrollo tal como retraso en la osificación de las extremidades anteriores, además encontraron que las células cartilaginosas estaban alteradas o muertas, con disminución del cartílago y trabéculas óseas escasas (Barroso-Moguel *et al.*, 1992).

En otro estudio realizado con acetato de talio, la administración ip (16 mg/kg) en dosis única a ratas recién nacidas (1 día después del nacimiento) y sacrificadas a los 8 y 50 días después de la aplicación, indujo reducción de la talla, alopecia, diarrea y atrofia muscular progresiva en ambos miembros posteriores, incluso 40% de los animales tratados murieron antes de completar el período de tratamiento (Barroso-Moguel *et al.*, 1996).

Gibson y Becker (1970) al administrar en los primeros días de gestación sulfato de talio de forma ip, varias dosis y en diferentes días a ratas hembras preñadas, encontraron reducción del peso corporal de los fetos, aumento en la incidencia de hidronefrosis y falta de osificación en vertebras; en tanto que la administración de TI en los últimos días de gestación, no mostró incidencia de anomalías, pero en general se presentó toxicidad materna como diarrea, letargo, irritabilidad, pérdida de pelo y falta de brillo en el mismo.

Otro estudio dirigido por Rossi *et al.* (1988), encontraron que ratas hembra y macho expuestos de manera pre- y postnatal a 1 mg/dl de sulfato de talio en agua bebible, presentaban retraso en el desarrollo y atrofia de los folículos pilosos y daño en la actividad motora.

Los seres humanos también están expuestos y presentan talio en su organismo como lo demuestra un trabajo realizado en la comunidad de Shanghai, China, donde evaluaron la exposición prenatal y neonatal a metales pesados, entre ellos TI. En este trabajo se examinaron 1652 parejas (madre e hijo) de 2008-2009, se evaluó la concentración de metales pesados en sangre de cordón umbilical. La

concentración de Tl fue de 0.02 µg/L, que es considerada como un nivel medio de exposición, estimado como seguro. Además, los autores asociaron la presencia de este metal en el cordón con el material de la tubería de agua de la vivienda. También encontraron, asociación entre la exposición a diferentes metales (Cd, Hg, As y Tl) durante la preñez con la disminución en el número de aciertos de la prueba de Comportamiento Neurológico Neonatal. Los autores remarcan el hecho de encontrar diferentes metales pesados en hijos de mujeres que no están expuestas laboralmente y que éstos pueden estar relacionados con partos prematuros y disminución del peso al nacer (Yu *et al.*, 2011).

Un estudio realizado en cuatro ciudades de China de junio a agosto de 2011, que incluyó 81 madres e hijos, en el cual se buscó la presencia de 9 metales, entre ellos el Tl en sangre materna y de cordón umbilical, se detectó Tl en 79 y 71.6 % de las muestras, respectivamente. También encontraron que el aumento de los niveles de Tl en madres tuvo efecto sobre el peso de los lactantes al nacer, y aunque esta asociación no fue estadísticamente significativa, se piensa que la exposición intrauterina a metales pesados (en particular al Tl) es potencialmente perjudicial para el desarrollo del feto, lo que lleva al retraso del crecimiento intrauterino y por consiguiente a un menor peso al nacer en los recién nacidos (Hu *et al.*, 2015).

Una publicación de Cataluña España, en la ciudad de Sabadell donde se realizó un análisis de orina entre el año 2004 y 2006 a 489 mujeres embarazadas en el primer y tercer trimestre de embarazo para identificar 12 metales, los resultados revelaron que las mujeres embarazadas tenían mayores concentraciones de Tl en el primer trimestre en comparación con el tercer trimestre de embarazo, donde esta diferencia puede deberse a los cambios metabólicos durante el periodo de gestación y a pesar de que los niveles de este metal se encuentran dentro del límite estimado, los autores concluyen que la medición de estos metales en cualquier etapa de embarazo proporcionan una estimación de la exposición durante todo el periodo de gestación (Fort *et al.*, 2014).

Otro estudio realizado en población humana en el que se midió la presencia de 13 metales en orina, entre ellos el TI, en mujeres embarazadas y no embarazadas, de diferentes etnias; blancas no hispanas, negras no hispanas, mexicanas americanas y otros, de datos obtenidos del 2003-2010 de la Agencia de Salud Nacional de Nutrición (NHANES) de los Estados Unidos, arrojaron que las concentraciones de distintos metales fueron variables, pero se encontraron niveles de TI en orina para todas las mujeres revisadas y en las mexicanas/americanas se registraron los niveles más altos de TI (Jain, 2013).

### *1.6 El ratón como modelo de experimentación en teratogénesis*

La teratogénesis se refiere a los cambios permanentes en el neonato que pueden ser defectos estructurales y funcionales causados por la exposición intrauterina a agentes teratógenos, incluso a niveles bajos de exposición que generalmente son inofensivos para sus progenitoras (Wells *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2014). Los ratones se han utilizado desde el siglo XIX en pruebas de toxicidad. Su alta fecundidad (capacidad de reproducción), gestación y vida corta hacen que sean útiles para el estudio de teratología además tienen tamaño pequeño y costo relativamente bajo, recomendable para cuando se necesitan datos de un gran número de animales. También existe una amplia gama de variantes genéticas que están bien caracterizadas anatómicamente y fisiológicamente (Sirois, 2005).

El nombre taxonómico del ratón de laboratorio es *Mus musculus* esta especie es miembro de la familia *muridae* y conocido como el ratón albino suizo o casero, es considerado como polígamo, ya que un ratón macho se aparea con varias hembras. Los ratones hembra son continuamente poliéstricos con un ciclo de 4 a 5 días. El estro dura aproximadamente de 9 a 20 h. La edad de la pubertad varía un poco entre las cepas diferentes, pero es generalmente 35 días, con la madurez sexual completa con 50 días en los machos y 50 a 60 días en las hembras. La ovulación espontánea se produce aproximadamente de 8 a 11 h después del inicio del estro. El apareamiento generalmente puede ser confirmado por la presencia de un tapón vaginal que normalmente persiste durante 16 a 24 h después de la cópula. La gestación es de 19 a 21 días, con un tamaño medio de la camada de

10 a 12 crías. Una considerable variación en tamaño de las camadas se ve con diferentes cepas y hembras de diferentes edades. Las hembras jóvenes suelen tener camadas más pequeñas. Las crías de los ratones nacen sin pelo y ciegos. El oído externo se abre al 3 día y abren los ojos de entre los 12 a los 14 días. Las crías son destetadas de entre los 11 a 14 días. Al igual que con otros murinos, el ratón macho tiene la papila genital más grande que las hembras y una mayor distancia entre la papila y el ano (Sirois, 2005).

### *1.7 Evaluación del esqueleto*

Durante la organogénesis la exposición a metales puede causar anomalías en el feto, mientras que durante otros períodos de gestación puede dar lugar a la letalidad embrionaria o fetal, y tener otros efectos sobre el desarrollo. Bioensayos de teratogénesis en roedores (hámster, ratones o ratas) dieron resultados positivos para los compuestos de varios metales (Al, As, Bo, Cd, Co, Cr, Cu, Ga, Hg, Li, Mn, Ni, Pb, Se, U, V y Zn), produciendo muertes fetales y postnatales tempranas, malformaciones como anencefalia, defectos oculares, paladar hendido y anomalías esqueléticas (Apostoli *et al.*, 2007; Menegola *et al.*, 2001).

En teratogénesis la evaluación de las anormalidades esqueléticas en animales de experimentación es un paso crucial para determinar la actividad teratogénica de diferentes agentes químicos, entre éstos los compuestos que en su estructura tienen metales (Menegola *et al.*, 2002). La técnica de tinción de hueso es la más utilizada en pruebas de teratología, no obstante, la técnica de tinción de cartílago y hueso ha facilitado la determinación de cambios en las vertebras, patas y costillas, además de ser más sensible para identificar cambios esqueléticos y cartilagosos y la recomendada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos para llevar a cabo estudios de toxicidad del desarrollo (Dodo *et al.*, 2009; Redfern *et al.*, 2007).

## *II. Justificación*

El Tl es un metal altamente tóxico independientemente de la vía de exposición (ingestión, inhalación, piel) y se considera que es uno de los metales más nocivos para los mamíferos; se distribuye por todo el cuerpo, puede cruzar la barrera encefálica, gonadal y placentaria, así como depositarse en diferentes órganos.

La exposición a este metal representa un riesgo para la población y ocurre de manera cotidiana por el consumo de agua y alimentos contaminados debido a la liberación de polvos y humos de plantas cementeras, procesos de refinación, producción de energía eléctrica y otros, llegando a la superficie de suelos, aire y agua de los lugares cercanos.

Datos de los efectos sobre el desarrollo producidos por la exposición a este compuesto son limitados y no son concluyentes. Por lo anterior, en este trabajo se planteó evaluar los efectos del acetato de talio ( $\text{CH}_3\text{COOTl}$ ) sobre el desarrollo embrionario y fetal de los descendientes de ratones hembras de la cepa CD-1 tratadas con este compuesto.

### *III. Hipótesis*

El TI es capaz de cruzar la barrera placentaria y producir toxicidad a diferentes niveles, por lo tanto, si se administra acetato de talio en el día 7 de gestación a hembras preñadas se espera encontrar efectos sobre el desarrollo embrionario y fetal de la descendencia.

### *IV. Objetivos*

#### *4.1 Objetivo General*

Evaluar los efectos del acetato de talio ( $\text{CH}_3\text{COOTI}$ ) en el desarrollo de los fetos obtenidos de ratones hembra de la cepa CD-1 tratadas en el día 7 con diferentes dosis.

#### *4.2 Objetivos Particulares*

- 1) Evaluar la toxicidad en las hembras tratadas con acetato de talio.
- 2) Evaluar la toxicidad embrionaria y fetal de las camadas obtenidas.
- 3) Evaluar las malformaciones externas en los fetos de las hembras tratadas con tres concentraciones de la sal de talio.
- 4) Evaluar las anormalidades esqueléticas (hueso y cartílago) en los fetos de las hembras tratadas con la sal de talio.

## *V. Materiales y Métodos*

### *5.1 Animales*

Se utilizaron ratones hembra sexualmente maduras de la cepa CD-1, de 3 meses de edad (entre 35 y 40 g de peso), las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM. Los ratones se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento para roedores (Harlan 20185), así como periodos de 12-12 h luz-oscuridad. Se mantuvieron a las condiciones de bioterio, con temperatura de 22°C y 31 % de humedad. Las hembras se pusieron a aparear con machos sexualmente maduros de la misma cepa en proporción 2:1.

Se revisó la presencia de tapón vaginal, considerando este como evidencia de cópula y como día cero de preñez. Las hembras se pesaron cada tercer día y se revisaron externamente: cambios de comportamiento, alopecia, diarrea o alguna otra que pudiera presentarse.

### *5.2 Compuestos químicos*

El acetato de talio se obtuvo de la empresa Riedel-de Haën Chemical Company ( $\text{CH}_3\text{COOT}$ , CAS no. 563-68-8, pureza  $\geq 97\%$ ; Munich, Alemania). Para dar los tratamientos el compuesto se disolvió en agua inyectable (Pisa, Mx). El cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) y azul de alciano se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chem. Co. El rojo de alizarina y la glicerina fueron de Hycel Mx.

### *5.3 Tratamientos*

Las hembras preñadas se dividieron en 5 grupos (10 hembras por grupo). El tratamiento se aplicó por inyección ip en el día 7 de gestación, 0.1 ml por cada 10 g de peso del ratón. Se tomó la  $\text{DL}_{50}$  del acetato de talio en ratón para realizar los tratamientos, que es de 37 mg/kg (Repetto y Del Peso, 2012). La aplicación se realizó a las 8:00 am y los grupos quedaron distribuidos de la siguiente manera:



- Grupo 1: testigo negativo; agua inyectable.
- Grupo 2: 1/8 de acetato de talio (4.6 mg/kg).
- Grupo 3: 1/4 de acetato de talio (9.2 mg/kg).
- Grupo 4: 1/2 de acetato de talio (18.5 mg/kg).
- Grupo 5: testigo positivo 3 mg/kg de CdCl<sub>2</sub>.

El cadmio es un metal tóxico reconocido por la Organización de las Naciones Unidas como un potencial teratógeno en seres humanos, y a lo largo de los años, ha habido numerosos estudios que revelan que el cadmio independientemente de la vía de administración puede producir gran variedad de malformaciones en ratas, ratones y hámsters (Paniagua-Castro *et al.*, 2007; Del Ángel-Martínez, 2010; Calle *et al.*, 2015; Rus y Checiu, 2014), razón por la que en este trabajo se utilizó como testigo positivo.

#### *5.4 Obtención de los fetos*

En el día 18 de gestación se pesaron las hembras, se sacrificaron por dislocación cervical y se expuso el útero para iniciar el siguiente registro de datos:

##### **Signos de toxicidad materna**

- Peso: se calculó la ganancia de peso durante la gestación, restando el peso final menos el inicial.
- Estado general de las hembras: pérdida de pelo o erizamiento del mismo.

##### **Parámetros para determinar embriotoxicidad y fetotoxicidad**

- Peso fetal por camada
- Número de fetos totales
- Número de reabsorciones
- Número de implantes totales
- Número de fetos vivos
- Número de fetos muertos

### *5.5 Anormalidades externas*

Los fetos se fijaron con alcohol al 70%, se registró la longitud de cada uno en centímetros y se observaron bajo el estereoscopio para registrar la frecuencia y tipos de anormalidades externas presentes en cabeza, tronco, cola y extremidades.

### *5.6 Anormalidades de hueso y cartílago - hueso*

Después de la revisión bajo el estereoscopio los fetos de cada una de las camadas se distribuyeron de la siguiente manera: 50 % se fijó con solución Bouin, 25 % se tiñó con rojo de alizarina para revisar anormalidades esqueléticas y el otro 25 % con azul de alciano y rojo de alizarina para revisión de cartílago y hueso.

### *5.7 Fijación con solución de Bouin*

Los fetos fueron colocados de 6-8 h en solución de Bouin y posteriormente en alcohol al 70% para trabajos posteriores (como cortes histológicos).

### *5.8 Técnica de tinción para hueso (rojo de alizarina)*

De cada feto se retiraron las vísceras abdominales y se colocó el tiempo requerido 3 días aproximadamente en rojo de alizarina (12mg/L) con hidróxido de potasio al 1% (10g/L).

### *5.9 Técnica de tinción de hueso y cartílago (rojo de alizarina y azul de alciano)*

De cada feto se retiraron las vísceras abdominales, después se procedió a teñir el cartílago por 6 días con azul de alciano (100mg/L disuelto en 800ml de etanol al 95% y 20 ml de ácido acético glacial) y finalmente con rojo de alizarina (12mg/L) con hidróxido de potasio al 1% (10g/L).

### *5.10 Análisis del esqueleto*

El análisis del esqueleto en los fetos para ambas técnicas incluye:

- Revisión de los huesos de cráneo
- Revisión de huesos de extremidades superiores e inferiores

- Número y forma de pares de costillas
- Número y forma de las esternebras
- Número y forma de las vértebras

### 5.11 Análisis estadístico

- Para el análisis estadístico de los datos se realizó una  $\chi^2$  en todos los casos (Tiboni *et al.*, 2006).

## VI. Resultados

### 6.1 Toxicidad materna

En el **Cuadro III**, se muestran los datos de las hembras tratadas con las tres diferentes dosis de acetato de talio 4.62, 9.25 y 18.5 mg/kg, administrado en el día 7 de gestación, donde no se observaron diferencias en la ganancia de peso, tampoco presentaron síntomas de toxicidad como pérdida de pelo o cambios en la conducta y todas llegaron al término de la preñez, por lo cual se puede decir que el tratamiento aplicado no produjo toxicidad materna.

**Cuadro III.** Hembras tratadas con acetato de talio en el día 7 de gestación.

	Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTl en mg/kg		
		4.62	9.25	18.5
Hembras examinadas	10	10	10	10
Ganancia de peso (g) *	31.61±5.93	27.35±6.56	32±7.00	33.784±5.26

\* Media ± Desviación estándar.

### 6.2 Toxicidad embrionaria y fetal

En el **Cuadro IV**, se muestran los datos de los productos de las hembras tratadas, medias de los implantes por camada, fetos vivos, hembras con reabsorciones,

reabsorciones totales, peso de las camadas, proporción de sexos y longitud de fetos, sin valores estadísticamente diferentes al grupo control.

**Cuadro IV.** Datos de los fetos obtenidos de las hembras tratadas con acetato de talio en el día 7 de gestación.

	Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
		4.62	9.25	18.5
Camadas revisadas	10	10	10	10
Implantes/camada *	15.2±2.27	12.2±4.74	15.9±3.56	15.9±2.84
Fetos vivos (* /camada)	147 (14.7± 2.23)	115 (11.5 ± 4.54)	147 (14.7± 3.19)	152 (15.2± 2.71)
Hembras con reabsorciones (%)	4(40)	6(60)	6(60)	4(40)
Total de reabsorciones: tempranas + tardías	5 (2+3)	7 (6 + 1)	11 (5 + 6)	7 (7+ 0)
Peso de la camada*	24.92±3.44	20.47±6.40	24.94±3.45	25.43±4.4
Machos/hembras (%)	68/79 (46.25/53.74)	48/67 (41.73/58.2)	61/86 (41.49/58.50)	65/87 (42.76/57.23)
Longitud de fetos en cm *	2.40±0.07	2.50±0.20	2.35±0.13	2.37±0.11

\* Media ± Desviación estándar.

### 6.3 Revisión de las anomalías externas

En el **Cuadro V**, se pueden apreciar los datos obtenidos después de la revisión externa de cada uno de los fetos obtenidos de las hembras tratadas en el día 7 de gestación, como se puede observar el número de fetos con tronco de lado se

incrementó en la dosis de 18.5 mg/kg, siete veces mayor que el testigo negativo, de manera estadísticamente significativa.

En las tres dosis de talio el número de fetos con rotación de extremidades superiores se incrementó significativamente en las dosis de 4.62 y 9.25 mg/kg con más del triple que el control negativo.

Para rotación de extremidades inferiores se observa incremento significativo en las tres dosis de acetato de talio, con más del triple en relación al control negativo, con un 70.74 %, 41.73 % y 31.57 % para los grupos de 9.25, 4.62 y 18.5 mg/kg respectivamente.

Los fetos que presentan cola curva y cola de lado en los tres grupos con talio se aumentan, siendo significativo solo en la dosis de 18.5 mg/kg para cola curva y en las dosis de 4.62 y 18.5 mg/kg para cola de lado. El porcentaje de fetos con cola de punta en gancho muestra ligeros aumentos en la dosis más alta 18.5 mg/kg, sin tener una significancia estadística. En la **Figura 2** se pueden apreciar algunas fotografías de las anomalías encontradas en los fetos de las hembras tratadas con acetato de talio.

**Cuadro V.** Evaluación externa de los fetos obtenidos de hembras tratadas con acetato de talio en el día 7 de gestación.

	Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
		4.62	9.25	18.5
Camadas examinadas	10	10	10	10
Fetos examinados	147	115	147	152
Fetos con anomalías externas (%)	27(18.36)	61 <sup>a</sup> (53.04)	106 <sup>a</sup> (72.10)	71 <sup>a</sup> (46.71)
Alteraciones externas encontradas (%):				
Tronco de lado	2(1.36)	1(0.86)	5(3.40)	14 <sup>a</sup> (9.21)
Extremidades superiores con rotación	2(1.36)	15 <sup>a</sup> (13.04)	13 <sup>a</sup> (8.84)	3(1.97)
Extremidades inferiores con rotación	19(12.92)	48 <sup>a</sup> (41.73)	104 <sup>a</sup> (70.74)	48 <sup>a</sup> (31.57)
Cola curva	1(0.68)	4(3.47)	3(2.04)	8 <sup>a</sup> (5.26)
Cola de lado	4(2.72)	10 <sup>a</sup> (8.69)	11(7.48)	12 <sup>a</sup> (7.89)
Cola con punta en gancho	4(2.72)	0	1(0.68)	7(4.60)

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo(χ<sup>2</sup>)



**Figura 2.** Fotos de fetos obtenidos de hembras tratadas con acetato de talio en el día 7 de gestación. En a) control negativo, sin anomalías; en b) cola de lado, dosis de 18.5 mg/kg; en c) rotación de extremidad superior derecha hacia abajo, tratamiento de 4.62

mg/kg; en d) rotación de extremidades inferiores, dosis 18.5 mg/kg; en e) extremidades inferiores con rotación y cola curva tratado con 4.62 mg/kg; en f) cola y tronco de lado, dosis de 18.5 mg/k y en g) cola con punta en gancho y extremidad inferior izquierda con rotación, tratamiento con 18.5 mg/kg.

#### ***6.4 Revisión del sistema esquelético***

Después de realizar la tinción con **rojo de alizarina** los fetos se revisaron por partes, la cabeza, esternón y costillas, extremidades superiores e inferiores, donde principalmente se observaron huesos parcialmente osificados (PO), los cuales tienen un aspecto poroso. También se observaron huesos con osificación incompleta (OI), es decir que el hueso no se tiñó completo y parece que les falta un pedazo; ambas pueden deberse a una osificación tardía.

#### **Huesos de cabeza**

Los datos del análisis de los huesos de la cabeza teñidos con rojo de alizarina (que sólo tiñe hueso), de cada feto las hembras tratadas con acetato de talio y del grupo testigo, se muestran en el **Cuadro VI**. En él se observa que los fetos testigo presentaron un 13% de OI en el exocipital, mientras que en los tratados con acetato de talio esta variación se incrementó en las tres dosis (4.62 mg/kg, 9.25 mg/kg y 18.5 mg/kg) en aproximadamente más del doble pero sin valores estadísticamente significativos.

En el grupo testigo no se observaron huesos PO, mientras que en los tratados con la dosis baja, siete de los huesos examinados presentaron un incremento, tres en la dosis intermedia y cinco en la dosis alta. En la dosis media también se presentó atlas engrosado.



**Cuadro VI.** Variaciones en la osificación de los huesos de la cabeza en fetos obtenidos de ratones hembras CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		34	27	31	39
Fetos con variación en cabeza (%)		13(38.23)	26 <sup>a</sup> (96.29)	28 <sup>a</sup> (90.32)	39 <sup>a</sup> (100)
Fetos con algún tipo de variación en la osificación de la cabeza (%):					
Frontal	PO	0	6 <sup>a</sup> (22.22)	4 <sup>a</sup> (12.90)	0
Parietal	PO	0	11 <sup>a</sup> (40.74)	5 <sup>a</sup> (16.12)	13 <sup>a</sup> (33.33)
Interparietal	PO	0	14 <sup>a</sup> (51.85)	2(6.45)	27 <sup>a</sup> (69.23)
Maxilar superior	PO	0	9 <sup>a</sup> (33.33)	0	16 <sup>a</sup> (41.02)
Mandíbula	PO	0	6 <sup>a</sup> (22.22)	0	13 <sup>a</sup> (33.33)
Hueso temporal	PO	0	3 <sup>a</sup> (11.11)	0	0
Exocipital	OI	13(38.23)	16(59.25)	23(74.19)	24(61.53)
Supraoccipital	PO	0	5 <sup>a</sup> (18.51)	7 <sup>a</sup> (22.58)	18 <sup>a</sup> (46.15)
	OI	0	0	3(9.67)	0
Atlas	Engrosada	0	0	0	5 <sup>a</sup> (12.82)
	OI	0	2(7.40)	4 <sup>a</sup> (12.90)	0

Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo(χ<sup>2</sup>)

### Huesos de esternón y costillas

En el **Cuadro VII.** Se muestran los datos de la revisión de huesos de esternón y costilla. El porcentaje de fetos con esternón asimétrico se incrementó en las tres dosis, en 4.62 mg/kg se observó 4.81% de fetos con costillas cortas, en 9.25 mg/kg se presentó 19.35% de fetos con osificación incompleta de esternón, en tanto que en la dosis más alta la diferencia estadística se presenta en esternón parcialmente osificado.

**Cuadro VII.** Variaciones en la osificación de los huesos de esternón y costillas de los fetos obtenidos de ratones hembras CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

	Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg			
		4.62	9.25	18.5	
Número de fetos examinados	34	27	31	39	
Fetos con variación en huesos de esternón y costilla (%)	18 (52.94)	26 (96.29)	27 (87.09)	39 (100)	
Fetos con algún tipo de variación en la osificación de esternón y costilla (%):					
	PO	3(8.82)	6(22.22)	7(22.58)	12 <sup>a</sup> (30.76)
	OI	1(2.94)	1(3.70)	6 <sup>a</sup> (19.35)	3(7.69)
Esternón	Trozado	0	2(7.40)	2(6.45)	3(7.69)
	Asimétrico	10(29.41)	23 <sup>a</sup> (85.18)	22 <sup>a</sup> (70.96)	31 <sup>a</sup> (79.48)
	Mancuerna	2(5.88)	5(18.51)	3(9.67)	7(17.94)
Costillas	Corta	0	4 <sup>a</sup> (4.81)	1(3.22)	3(7.69)
	Rudimentaria	2(5.88)	3(11.11)	1(3.22)	9(23.07)
	Extra	0	1(3.70)	0	2(5.12)

Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo(χ<sup>2</sup>)

### Huesos de extremidades superiores

En el **Cuadro VIII.** Se encuentran las variaciones encontradas en los huesos examinados de las extremidades superiores de los fetos, donde se puede observar que algunas variaciones que no se observan en el grupo testigo presentan valores mínimos en los grupos tratados, otros como radio parcialmente osificado y angosto muestran un mayor porcentaje en los grupos tratados pero sin valores estadísticamente significativos en todos los casos.

**Cuadro VIII.** Variaciones en la osificación de los huesos de las extremidades superiores de los fetos obtenidos de ratones hembra CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		34	27	31	39
Fetos con variación en esternón (%)		5 (14.7)	7 (25.92)	9 (29.03)	13 (33.33)
Fetos con algún tipo de variación en la osificación de extremidades superiores (%):					
Escápula	OI	0	2 (7.40)	2(6.45)	0
Cúbito	OI	0	0	1 (3.22)	1 (2.56)
	Angosto	0	0	2(4.87)	0
Radio	PO	2 (5.88)	4 (14.81)	4 (12.90)	7(17.94)
	Angosto	3 (8.82)	2 (7.40)	3 (9.67)	6 (15.38)

Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo(χ<sup>2</sup>)

### Huesos de extremidades inferiores

En el **Cuadro IX**, se muestran las variaciones encontradas en los huesos examinados de las extremidades inferiores, para el peroné sobre la tibia, recto y curvo, presenta un incremento estadísticamente significativo, en al menos uno de los tres tratamientos con talio.

**Cuadro IX.** Evaluación de los huesos de extremidades inferiores de los fetos obtenidos de ratones hembra CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		34	27	31	39
Fetos con variación en extremidades inferiores (%)		2 (5.88)	21 <sup>a</sup> (77.77)	23 <sup>a</sup> (74.19)	37 <sup>a</sup> (94.87)
Fetos con algún tipo de variación en la osificación de las extremidades inferiores (%):					
Ilión	PO	0	0	0	2(5.12)
Fémur	PO	0	0	2 (6.45)	3 (7.69)
Tibia	Angosto	0	0	2 (6.45)	0
	Recto	0	0	0	10 <sup>a</sup> (25.64)
	Sobre la Tibia	2(5.88)	21 <sup>a</sup> (77.77)	19 <sup>a</sup> (61.29)	26 <sup>a</sup> (66.66)
Peroné	Angosto	0	0	2 (6.45)	0
	Curvo	0	6 <sup>a</sup> (22.22)	0	8 <sup>a</sup> (20.51)
	PO	0	0	0	4 (10.25)

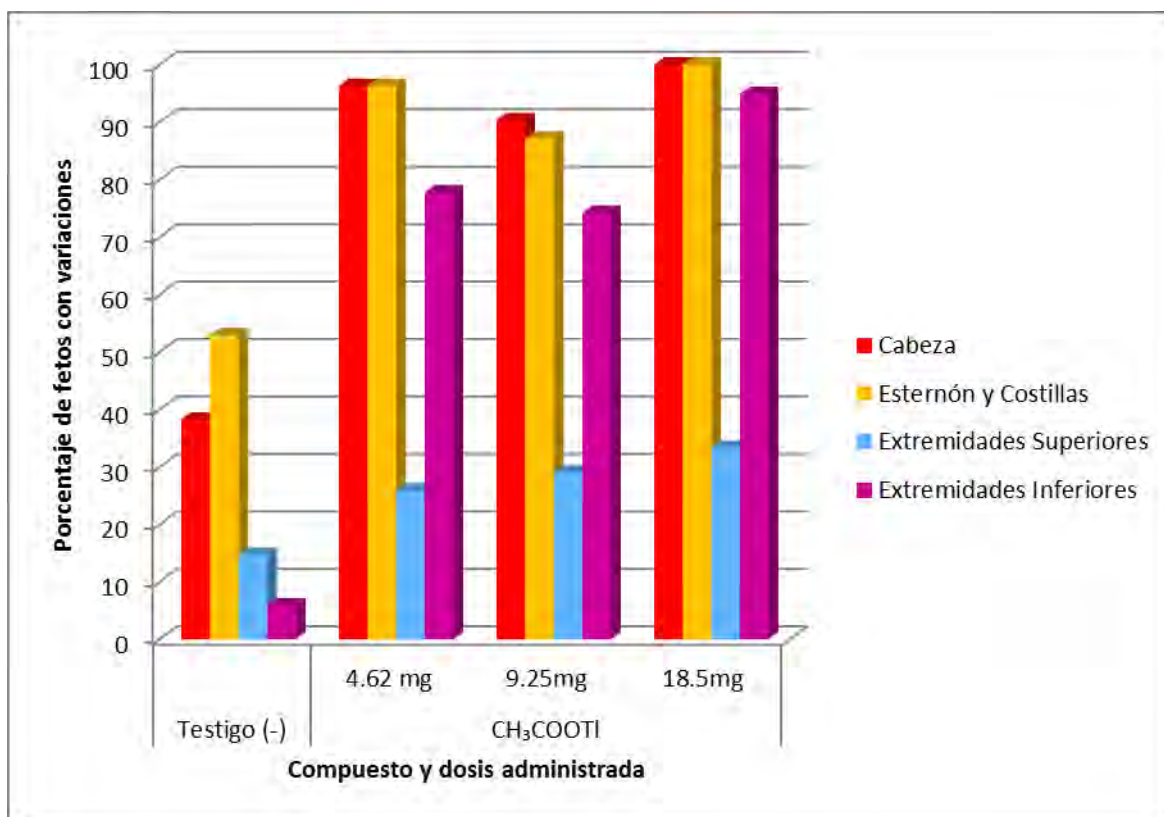
Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P< 0.05 tratado vs. testigo negativo( $\chi^2$ )

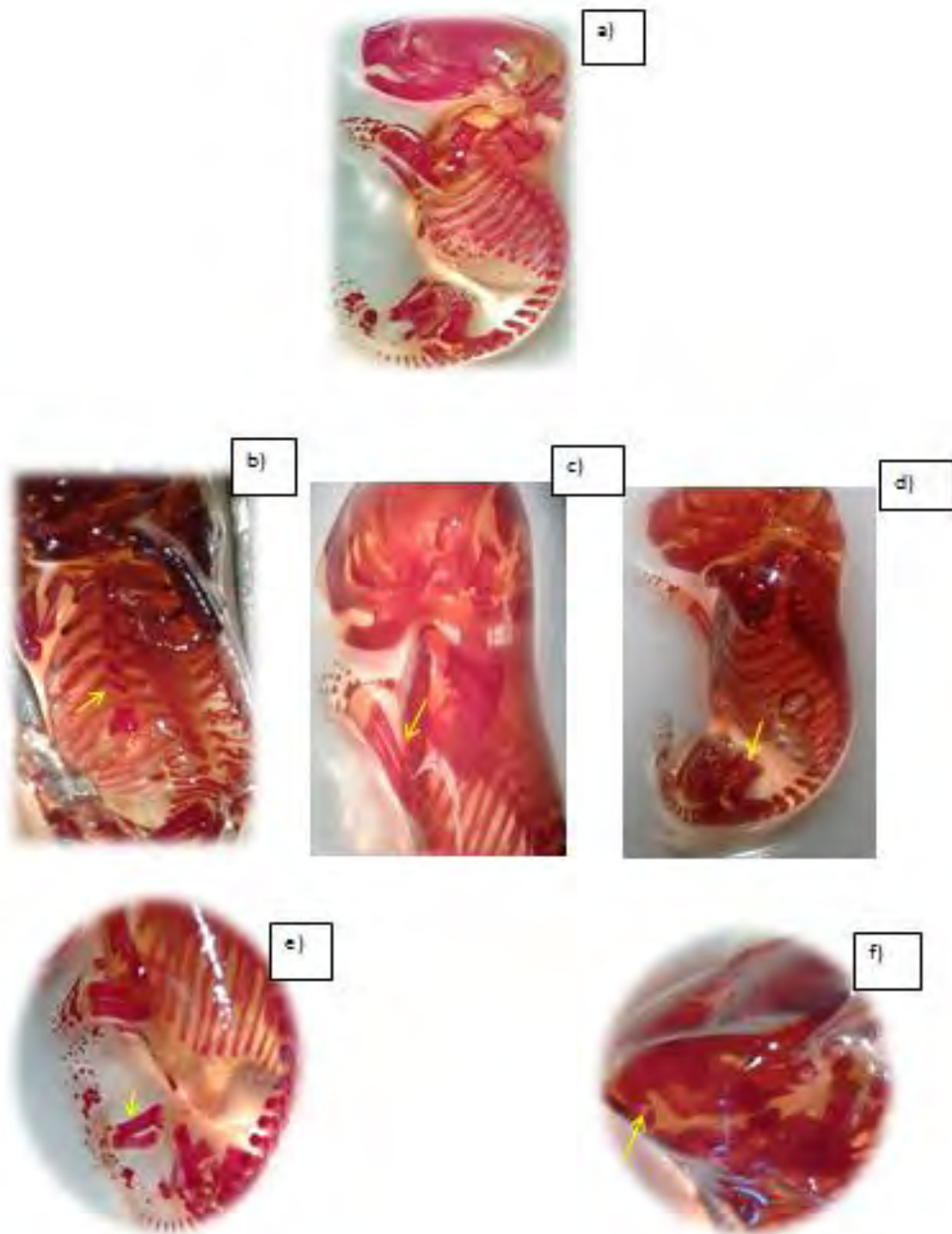
### Porcentaje de fetos con variaciones en huesos

Los datos de fetos con una o más variaciones en los huesos de cabeza, costillas-esternón, extremidades superiores e inferiores correspondientes a los cuadros VI, VII, VIII y IX respectivamente, se muestran en la **Figura 3**. En la que se observa que el porcentaje de fetos tratados con acetato de talio que presentaron al menos una variación en la osificación, se incrementó en todas las regiones examinadas y están por encima del grupo testigo, alcanzando hasta el 100% de variaciones para la dosis de 18.5 mg/kg en cabeza y esternón-costillas, el 94.87% en extremidades inferiores para la misma dosis y un 33.33% para las extremidades superiores. La

**Figura 4**, muestra fotografías de algunas variaciones encontradas en huesos de los fetos obtenidos de las hembras tratadas con acetato de talio en el día 7 de gestación.



**Figura 3.** Porcentaje de variaciones en huesos de los fetos tratados con acetato de talio en el día 7 de gestación.



**Figura 4.** Fotos de fetos con variaciones esqueléticas en fetos tratados en el día 7 de gestación con acetato de talio, tinción de hueso. En a) testigo, sin anomalías; en b) osificación asimétrica de las esternebras de la dos a cuatro y

en forma de mancuerna la seis, dosis de 18.5 mg/kg; en c) radio angosto, tratamiento de 18.5 mg/kg; en d) peroné sobre la tibia, dosis de 4.62 mg/kg; en e) peroné sobre la tibia, de 9.25 mg/kg y en f) osificación incompleta del exocipital, dosis de 18.5 mg/kg.

### **Cartílago y huesos de cabeza**

Después de realizar la tinción con **azul de alciano** más rojo de alizarina, los fetos se revisaron de la misma manera que los inspeccionados anteriormente para hueso. Las variaciones en el cartílago y hueso de cabeza de los fetos obtenidos de las hembras tratadas con talio se muestran en el **Cuadro X**. La PO presenta un incremento significativo con respecto al testigo en los huesos; frontal, parietal, interparietal y supraoccipital en las tres dosis con talio. Mientras que el maxilar superior, mandíbula, temporal y el exocipital se incrementó en al menos uno de los grupos tratados.

Los huesos con osificación incompleta (OI) como el supraoccipital tiene un incremento significativo con respecto al grupo testigo en la dosis de 9.25 mg/kg, el atlas en las dosis media y alta, otros como el maxilar superior y exocipital se observan en al menos uno de los grupos tratados sin valores estadísticamente diferentes. En el caso del atlas asimétrico y engrosado presentan valores en al menos una de las dosis de los grupos tratados sin ser estadísticamente significativos.

**Cuadro X.** Evaluación del cartílago y huesos de cabeza de los fetos obtenidos de ratones hembra CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		41	33	41	41
Fetos con variación en cartílago y huesos de cabeza (%)		10 (24.39)	32 <sup>a</sup> (96.96)	39 <sup>a</sup> (95.12)	39 <sup>a</sup> (95.12)
Fetos con algún tipo de variación en el cartílago y en la osificación de cabeza (%):					
Nasal	PO	0	3 (9.09)	0	0
Frontal	PO	0	6 <sup>a</sup> (18.18)	14 <sup>a</sup> (34.14)	9 <sup>a</sup> (21.95)
Parietal	PO	0	24 <sup>a</sup> (72.72)	26 <sup>a</sup> (63.41)	24 <sup>a</sup> (58.53)
Interparietal	PO	0	27 <sup>a</sup> (81.81)	24 <sup>a</sup> (58.53)	32 <sup>a</sup> (78.04)
Maxilar superior	PO	0	2 (6.06)	0	7 <sup>a</sup> (17.07)
	OI	0	0	2 (4.87)	0
Mandíbula	PO	0	3 (9.09)	3 (7.31)	9 <sup>a</sup> (21.95)
Hueso temporal	PO	0	6 <sup>a</sup> (18.18)	5 <sup>a</sup> (12.19)	0
Exocipital	OI	10 (24.39)	13 (39.39)	13 (31.70)	20 (48.7)
	PO	0	0	4 <sup>a</sup> (9.75)	0
Supraoccipital	PO	0	14 <sup>a</sup> (42.42)	6 <sup>a</sup> (14.63)	21 <sup>a</sup> (51.21)
	OI	0	0	7 <sup>a</sup> (17.07)	0
Atlas	Asimétrica	0	3 (9.09)	0	2 (4.87)
	Engrosada	0	3 (9.09)	2 (4.87)	3 (7.31)
	OI	0	0	4 <sup>a</sup> (9.75)	4 <sup>a</sup> (9.75)
	PO	0	0	0	2 (4.87)

Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P< 0.05 tratado vs. testigo negativo( $\chi^2$ )

### Cartílago y huesos de esternón y costillas

Se muestran los resultados de la evaluación de cartílago y hueso en esternón y costillas de los fetos tratados en el **Cuadro XI**. El esternón PO y la OI tienen valores



estadísticamente significativos en los tres grupos tratados. Otras variaciones en esternón, como el asimétrico con valores significativos en los tres grupos tratados con más del doble que el testigo, el esternón en mancuerna también se observa con un valor mayor en la dosis de 4.62 y 18.5 mg/kg y el trozado en la dosis mayor.

Otras variaciones como costillas rudimentarias con un valor estadísticamente diferente en la dosis de 4.62 mg/kg de acetato de talio, y desplazadas hacia abajo en las dosis de 4.62 y 18.5 mg/kg.

**Cuadro XI.** Evaluación de cartílago y huesos de esternón y costillas de los fetos obtenidos de ratones hembra CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		41	33	41	41
Fetos con variación en cartílago y huesos de esternón y costilla (%)		13 (31.70)	32 <sup>a</sup> (96.96)	31 <sup>a</sup> (75.6)	39 <sup>a</sup> (95.12)
Fetos con algún tipo de variación en cartílago y huesos de esternón y costillas (%):					
Esternón	PO	3 (7.31)	6 (18.18)	4 (9.75)	15 <sup>a</sup> (36.58)
	OI	0	7 <sup>a</sup> (21.21)	4 <sup>a</sup> (9.75)	6 <sup>a</sup> (14.63)
	Trozada	0	3 (9.09)	2 (4.87)	4 <sup>a</sup> (9.75)
	Asimétrica	8 (19.51)	26 <sup>a</sup> (78.78)	23 <sup>a</sup> (56.09)	31 <sup>a</sup> (75.60)
	Mancuerna	0	6 <sup>a</sup> (18.18)	3 (7.31)	4 <sup>a</sup> (9.75)
Costillas	Corta	1 (2.43)	3 (9.09)	4 (9.75)	3 (7.31)
	Rudimentaria	1 (2.43)	6 <sup>a</sup> (18.18)	5 (12.19)	6 (14.63)
	Extra	0	2 (6.06)	0	0
	Desplazadas hacia abajo	0	5 <sup>a</sup> (15.15)	0	7 <sup>a</sup> (17.07)
Vertebras torácicas	Desalineadas	0	0	2 (4.87)	0

Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo (χ<sup>2</sup>)

### Cartílago y hueso de extremidades superiores

Las variaciones de cartílago y hueso en extremidades superiores se muestran en el **Cuadro XII**. Los huesos parcialmente osificados (PO) como el radio y el cúbito muestran valores estadísticamente significativos en la dosis mayor, los huesos con OI y otras variaciones no muestran valores significativos.

**Cuadro XII.** Evaluación de cartílago y huesos de extremidades superiores de los fetos obtenidos de ratones hembra CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratamientos con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		41	33	41	41
Fetos con variación en cartílago y hueso de extremidades superiores (%)		3 (7.31)	10 <sup>a</sup> (30.30)	7 (17.07)	21 <sup>a</sup> (51.21)
Fetos con algún tipo de variación en cartílago y en la osificación de extremidades superiores (%):					
Escápula	PO	0	0	1 (2.43)	2 (4.87)
	OI	0	0	1 (2.43)	2 (4.87)
Cúbito	Curvo	0	3 (9.09)	1 (2.43)	3 (7.31)
	PO	0	0	2 (4.87)	4 <sup>a</sup> (9.75)
Radio	PO	1 (2.43)	2 (6.06)	4 (9.75)	7 <sup>a</sup> (17.07)
	Angosto	0	2 (6.06)	1 (2.43)	0
	Curvo	2 (4.87)	4 (12.12)	1 (2.43)	6 (14.63)

Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo(χ<sup>2</sup>)

### Cartílago y hueso de extremidades inferiores

Las variaciones de cartílago y hueso encontradas en extremidades inferiores se muestran en el **Cuadro XIII**. El porcentaje de fetos que presentaron peroné sobre

la tibia, se incrementó en los tres grupos tratados con valores estadísticamente significativos en relación al grupo testigo. Para el fémur angosto, peroné curvo y angosto se observan valores significativos en al menos una de las dosis con talio.

**Cuadro XIII.** Evaluación de cartílago y hueso de extremidades inferiores de los fetos obtenidos de ratones hembra CD-1 tratadas en el día 7 de gestación con CH<sub>3</sub>COOTI.

		Testigo	Tratados con CH <sub>3</sub> COOTI en mg/kg		
			4.62	9.25	18.5
Número de fetos examinados		41	33	41	41
Fetos con variación en cartílago y huesos de extremidades inferiores (%)		8 (19.51)	32 <sup>a</sup> (96.96)	30 <sup>a</sup> (73.17)	38 <sup>a</sup> (92.68)
Fetos con algún tipo de variación en el cartílago y osificación de extremidades inferiores (%):					
Ilion	PO	0	0	0	2 (4.87)
Fémur	PO	0	2 (6.06)	2 (6.45)	0
	Angosto	0	11 <sup>a</sup> (33.33)	1 (2.43)	9 <sup>a</sup> (21.95)
Tibia	Curva	0	2 (6.06)	2 (6.45)	0
	PO	0	0	0	2 (4.87)
Peroné	Recto	5 (12.19)	0	0	10 (24.39)
	Sobre la Ti	3 (7.31)	29 <sup>a</sup> (87.87)	24 <sup>a</sup> (58.53)	27 <sup>a</sup> (65.85)
	Angosto	0	2 (6.06)	3 (7.31)	7 <sup>a</sup> (17.07)
	Curvo	0	2 (6.06)	4 <sup>a</sup> (9.75)	11 <sup>a</sup> (26.82)

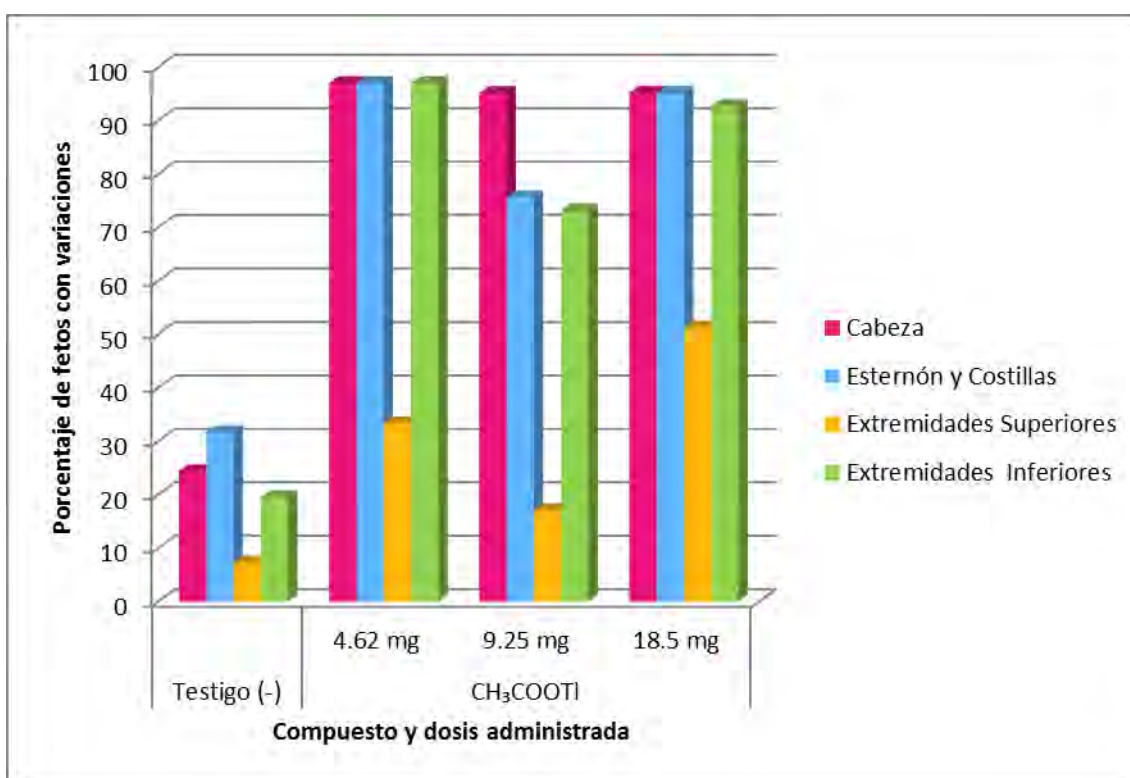
Tipo de variación: PO, parcialmente osificado (hueso poroso); OI, osificación incompleta.

<sup>a</sup>P < 0.05 tratado vs. testigo negativo (χ<sup>2</sup>)

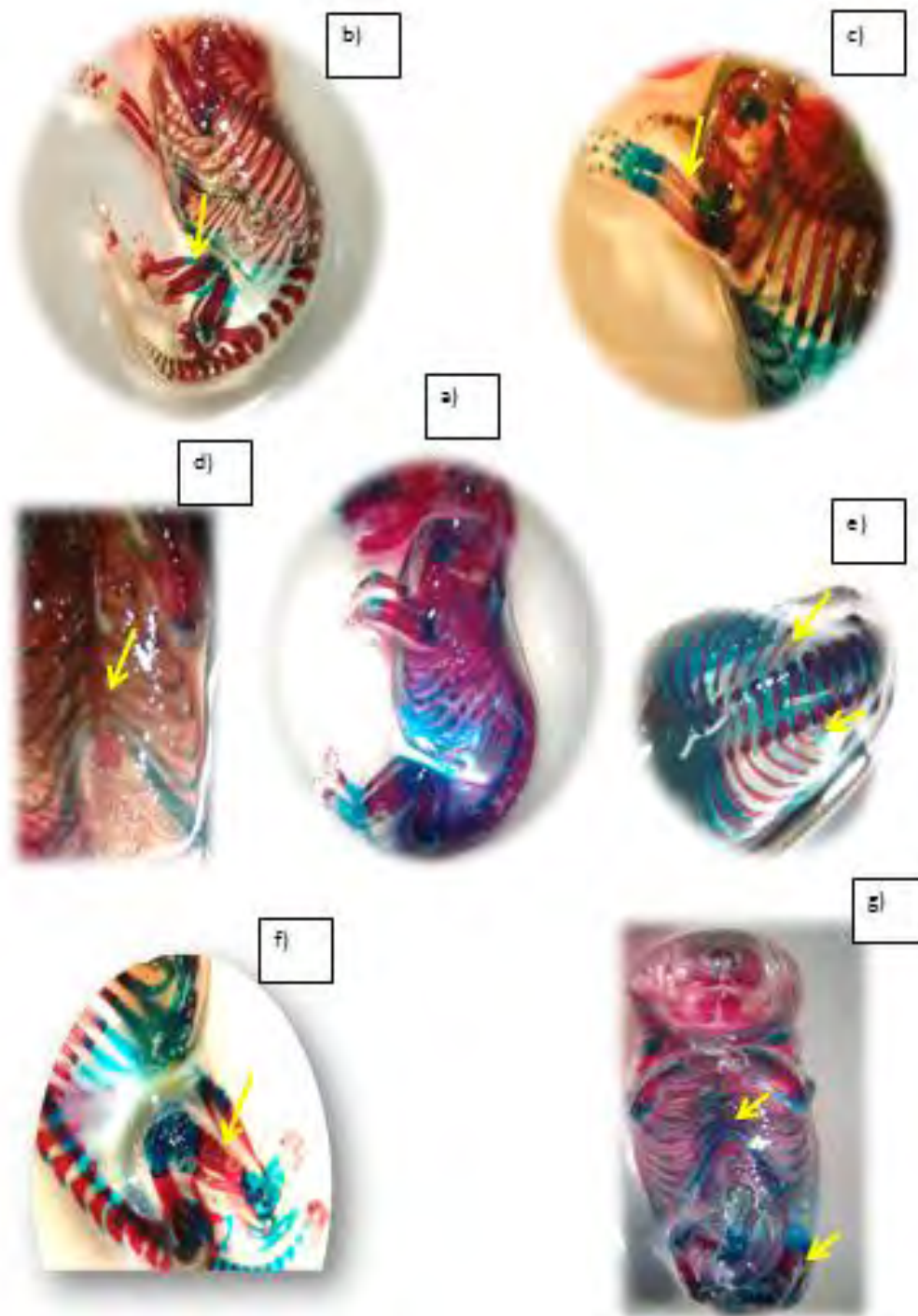
### Porcentaje de fetos con variaciones en cartílago y huesos

Los fetos con una o más variaciones en cartílago y hueso de cabeza, costillas-esternón y extremidades superiores e inferiores correspondientes a los cuadros X,

XI, XII y XIII respectivamente, se incrementaron con respecto al testigo en todos los grupos tratados con acetato de talio, se muestran en la **Figura 5**. Alcanzando hasta un 96.96% para la dosis de 4.62 mg/kg en cabeza, esternón-costillas y extremidades inferiores, y para las superiores el 51.21% en la dosis de 18.5 mg/kg. La **Figura 6**, muestra fotografías de algunas variaciones encontradas en cartílago y huesos de los fetos obtenidos de las hembras tratadas con acetato de talio en el día 7 de gestación.



**Figura 5.** Porcentaje de variaciones en cartílago y huesos de los fetos tratados con acetato de talio en el día 7 de gestación.



**Figura 6.** Fotos de fetos con variaciones esqueléticas tratados con talio, tinción de cartílago y hueso. En a) testigo, sin anomalías; en b) peroné sobre la tibia tratado con 18.5 mg/kg; en c) radio parcialmente osificado, con 18.5 mg/kg; en d) esternón número cinco trozada, dosis de 9.25 mg/kg; en e) costillas extra

(14) y rudimentaria del lado derecho y costilla corta del lado izquierdo, tratado con 18.5 mg/kg; en f) peroné sobre la tibia, con 18.5 mg/kg y en g) esternebras asimétricas y extremidad inferior con peroné sobre la tibia, dosis de 4.62 mg/kg.

## *VII. Discusión*

Los metales pesados son contaminantes ubicuos con propiedades tóxicas conocidas. La exposición de los humanos a estos químicos puede ocurrir de forma ocupacional, pero para la población en general, el aire, los alimentos y el agua son las fuentes más comunes de exposición (Amaya *et al.*, 2013).

Las mujeres embarazadas son consideradas un grupo vulnerable en términos de exposición a compuestos metálicos, incluyendo a aquellos que no se sabe que tengan alguna función biológica, debido a que los metales tienen afinidad por los ligandos y moléculas transportadoras usadas por los elementos esenciales, además algunos de sus iones son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, gonadal y placentaria, lo que puede tener impacto en la salud del feto en desarrollo (Callan, 2013; Fort *et al.*, 2014).

Para el caso particular de los mamíferos, la etapa prenatal es la más sensible en el desarrollo de un organismo, debido al alto grado de división y diferenciación celular, los embriones y el feto son muy susceptibles al efecto de posibles teratógenos, generalmente a dosis de exposición que no necesariamente son peligrosas para la madre. Si la exposición se presenta durante la organogénesis pueden producirse cambios estructurales permanentes y si la exposición se origina al finalizar puede provocar cambios funcionales (Al-Saleh *et al.*, 2011).

El Tl y sus compuestos, son ampliamente utilizados en varios procesos industriales y de ahí pasan al aire, agua y suelo llegando a los alimentos que consume la población en general, se acumulan en el organismo y son capaces de cruzar la barrera hemato-encefálica, -gonadal y placentaria, se tiene bien documentada su toxicidad, pero los efectos del talio en la reproducción y en el

desarrollo son pocos, de aquí el interés de elucidar los efectos que pueda inducir el TI sobre el desarrollo.

Los trabajos de investigación con animales ha mostraron que el TI produce efectos sobre el aparato reproductor masculino, en embriones de pollo la exposición a este metal durante el desarrollo puede producir anomalías como acortamiento severo de los huesos largos tanto del ala como de la pierna, tibia curvada y crecimiento excesivo de la mandíbula superior (pico de loro) (Hall, 1977). En rata reportaron retraso en el desarrollo, atrofia de los folículos pilosos y daño en la actividad motora (Gibson y Becker, 1970; Rossi *et al.*, 1988), mientras que en ratón los reportes son contradictorios y poco concluyentes (Léonard y Gerber, 1997). Por lo que en este trabajo se revisaron los fetos de ratones hembra tratadas con tres diferentes dosis de acetato de talio aplicadas en el día siete de gestación.

### **Toxicidad materna**

En los mamíferos el embrión y el feto están rodeados por el sistema materno y dependen de éste. Excepto por los agentes físicos, todo a lo que esté expuesta la madre pasa a través del flujo sanguíneo materno y la placenta antes de llegar al embrión o feto en desarrollo. El metabolismo, almacenamiento y excreción puede alterar significativamente la llegada del compuesto químico hacia el producto. Aún después del nacimiento el recién nacido puede continuar dependiendo de la nutrición materna si es amamantado y puede seguir expuesto (Sharma y Mogra, 2013).

Durante la evaluación del efecto de los compuestos químicos, sobre el desarrollo embrionario, también se evalúa la toxicidad materna ya que cualquier factor que modifique la homeostasis de la hembra puede afectar el desarrollo de la descendencia o progenie.

Frecuentemente la toxicidad materna se manifiesta como reducción o ganancia exagerada de peso, signos clínicos como caída de pelo, cambios en la ingesta del alimento, diarrea, sangrado, etc. o efectos más sutiles como cambios en el

comportamiento. En general no se considera que esta sea responsable de inducir malformaciones fetales importantes, pero se ha asociado con disminución de peso fetal y con pequeñas anormalidades óseas como costillas onduladas en ratas. Por otro lado, la toxicidad embrionaria o fetal no puede ser confirmada si los defectos en el desarrollo ocurren solamente a dosis donde la toxicidad materna también se produce (Bolon, 2015; Dos Santos, 2015).

En este trabajo se administró, de forma aguda, por inyección intraperitoneal  $\text{CH}_3\text{COOTl}$  a ratonas hembra en el día 7 de gestación. Durante todo el trabajo los animales se pesaron y se revisaron externamente, al finalizar los parámetros de toxicidad materna no mostraron diferencia con los del grupo control, por lo cual podemos decir que el tratamiento aplicado no causó toxicidad materna. Sin embargo, Gibson y Becker en 1970, reportaron que la administración de varias aplicaciones de sulfato de talio ( $\text{Tl}_2\text{SO}_4$ ) vía intraperitoneal, a ratas hembra preñadas Sprague-Dawley les provocó diarrea, letargo, irritabilidad, falta de brillo en el pelo y pérdida del mismo en todos los grupos tratados.

Otro trabajo en el cual se administró  $\text{Tl}_2\text{SO}_4$  vía oral (1mg/dl) a ratas gestantes, desde el primer día de gestación hasta el destete no se reportó efecto en el peso corporal materno y tampoco en la duración del periodo de gestación (Rossi *et al.*, 1988).

Por lo anterior podemos ver que, al igual que como sucede con otros iones metálicos, la toxicidad materna producida por el talio depende del compuesto aplicado, el tiempo y duración de la exposición, la vía de administración, y como sucede con algunos otros metales de la composición química y el estado de oxidación del mismo (Apostoli y Catalani, 2011). Por lo que se considera necesario hacer más trabajos experimentales con  $\text{CH}_3\text{COOTl}$  y otras sales de este metal en ratones como modelo de prueba.

### **Toxicidad embrionaria y fetal**

La exposición fetal a factores ambientales ocurre a través del líquido amniótico, la placenta, y el cordón umbilical, ha sido ampliamente demostrado que la barrera



placentaria no es completamente impermeable al paso de sustancias nocivas o agentes tóxicos (Caserta *et al.*, 2013). En 1978 se determinó el paso de  $Tl^+$  a través de la placenta en ratas Wistar y ratón kisslegg alimentada con 8 mg/kg de  $Tl_2SO_4$ , donde se encontró que el riñón de la hembra tenía concentraciones altas de la sal y podían ser detectadas aun después de 50 h de la administración. En el tejido fetal la máxima concentración de Tl fue encontrada después de 4 h de la administración y no se reportaron diferencias entre rata y ratón (Ziskoven *et al.*; 1983).

Cuando se revisa la morfología de cada sitio de implantación los que contienen fetos viables presentan tamaño, color y forma característica del estado de desarrollo dependiendo de los días de gestación. Mientras que otros tienen tamaño reducido o no se observa el feto y en su lugar hay tejido altamente necrosado o decidua sin embrión o un embrión en autólisis (reabsorción) (Bolon, 2015), indicando que el embrión murió y se está produciendo una digestión enzimática del tejido. El Tl en forma de acetato de talio utilizado en este trabajo y administrado a ratones hembra en el día 7 de gestación, no produjo toxicidad embrionaria, los valores no muestran diferencias significativas en ninguno de los grupos tratados con talio. Lo que concuerda con, Gibson y Becker, 1970, no reportaron incremento en las reabsorciones al administrar 2.5 mg/kg de  $Tl_2SO_4$ , varios días y administraciones de forma intraperitoneal durante la gestación a ratas Sprague-Dawley preñadas.

Por otro lado, los parámetros para medir fetotoxicidad incluyen número de camadas afectadas, número de fetos vivos o muertos y con malformaciones (Bolon, 2015). En este trabajo no se observó muerte fetal que es uno de los parámetros considerados. La longitud y peso de los fetos no mostraron diferencias significativas, lo que concuerda con un estudio realizado por Rossi *et al.* (1988), en el que los pesos de las crías de las ratas tratadas, no se ven afectados al administrar 1mg/dl de  $Tl_2SO_4$  en agua bebible desde el primer día de gestación hasta el destete. Pero Gibson y Becker (1970), reportan que el peso corporal fetal se ve disminuido con la administración de este compuesto, varias aplicaciones de

forma intraperitoneal. Los pocos trabajos reportados con  $Tl_2SO_4$  no reportan diferencias en la longitud de los fetos.

Por lo que podemos decir que la administración intraperitoneal de  $CH_3COOT$  a ratones hembra preñadas, no produce embriotoxicidad y tampoco fetotoxicidad al menos con las dosis probadas.

### **Variaciones fetales externas**

Trabajos realizados con  $Tl_2SO_4$  en embriones de pollo reportan que la exposición a este metal durante el desarrollo puede producir anomalías como acortamiento severo de los huesos largos tanto del ala como de la pierna, tibia curvada y crecimiento excesivo de la mandíbula superior (pico de loro) (Hall 1977). En rata reportaron retraso en el desarrollo, atrofia de los folículos pilosos y daño en la actividad motora (Gibson y Becker, 1970; Rossi *et al.*, 1988), mientras que en ratón los reportes son contradictorios (Leonard y Gerber, 1997).

En este trabajo, al aplicar una inyección intraperitoneal de acetato de talio, en el día 7 de gestación, se encontró que los fetos de ratón presentaron tronco de lado (18.5 mg/kg), rotación de extremidades superiores (4.62 y 9.25 mg/kg) e inferiores (4.62, 9.25 y 18.5 mg/kg), cola curva (18.5 mg/kg) y de lado (4.62 y 18.5 mg/kg). La variación con mayor presencia es la rotación de extremidades inferiores y superiores. Este tipo de anomalías son consideradas variaciones o defectos de postura (Bolon, 2015) pero no llegan a definirse como una anomalía, porque no son cambios permanentes (Chahoud *et al.*, 2015) y no se sabe si tienen alguna repercusión en la salud del feto, se tendría que dejar a término al feto al menos hasta el destete y posteriormente revisarlo, para comprobar si es permanente. Ya que una malformación, se define como un cambio estructural permanente que afecta adversamente la sobrevivencia o salud de la especie investigada (Chahoud *et al.*, 2015).

La rotación de extremidades superiores e inferiores encontradas en este trabajo puede estar relacionada con la atrofia muscular progresiva en el músculo del peroneo reportado por Barroso-Moguel *et al.*, 1996 en ratas de un día de nacidas

a las que se les administró 16 mg/kg de CH<sub>3</sub>COOTI vía intraperitoneal. Esto confirma que el compuesto está causando efecto en las extremidades inferiores.

### **Variaciones esqueléticas**

El hueso y el cartílago son tejidos altamente especializados y complejos que proporcionan rigidez funcional para el cuerpo de los vertebrados. El cartílago predomina en el esqueleto embrionario temprano, pero este se sustituye progresivamente por hueso al avanzar la edad, los agentes tóxicos influyen en estos tejidos (Lansdow, 1993). Es por ello que la tinción del esqueleto fetal es un método importante en los estudios de toxicología del desarrollo ya que permite una rápida y detallada observación del esqueleto sin necesidad de utilizar técnicas costosas (Menegola *et al.*, 2001; Redfern *et al.*, 2007).

Si bien la técnica de tinción con rojo de alizarina aporta una gran cantidad de datos sobre el sistema esquelético, la tinción de cartílago y hueso (con rojo de alizarina y azul de alciano) permite la evaluación completa, abarcando ambos, permitiendo distinguir si se presenta osificación tardía (PO u OI), o se encuentra ausente el hueso (Chahoud *et al.*, 2015; Dodo *et al.*, 2009).

La osificación tardía es una anomalía donde el efecto es temporal ya que solo se retrasa el proceso y estas se terminan de osificar conforme continúa el desarrollo (Dodo *et al.*, 2009). Lo anterior de acuerdo con la clasificación de anomalías en el hueso y el cartílago realizada por Chahoud *et al.* (2015).

En este trabajo las anomalías en los huesos (rojo de alizarina) de los grupos tratados con CH<sub>3</sub>COOTI se incrementaron al doble, llegando a presentarse en todos los fetos examinados, como en el caso de cabeza, esternón-costillas y extremidades inferiores, lo mismo que para las de hueso y cartílago.

Respecto a los resultados de osificación tardía en hueso, nuestros resultados son comparables con el estudio realizado en embriones de pollo en el que se encontró una reducción en el crecimiento de las extremidades o huesos largos, al administrar 0.6 mg/huevo de Ti<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Hall, 1977). Aunque en el caso de los pollos sí

se observan malformaciones y no solo retraso en la osificación. Por lo que se propone que el TI disminuye la síntesis de glucosaminoglicanos y retarda la deposición de calcio en la matriz extracelular afectando de esta forma el desarrollo de los huesos (Hall, 1977; Haschek y Rousseaux, 1998).

Por otra parte, la rotación de extremidades inferiores encontrada en este trabajo al revisar externamente los fetos bajo el estereoscopio concuerda con las observaciones de peroné sobre la tibia registrada en la tinción de hueso, ya que el porcentaje encontrado en ambos análisis es consistente en las tres dosis probadas de  $\text{CH}_3\text{COOTI}$ , es decir, que se está afectando el proceso de formación de las extremidades inferiores principalmente.

Se sabe que algunos metales que son teratógenos, uno de los principales órganos que afectan es el sistema esquelético (Ungváry *et al.*, 2001). Fetos con peso y talla disminuida frecuentemente presentan retardo en la osificación de huesos de desarrollo tardío como las estructuras de las extremidades distales, columna vertebral, caja torácica y esternón. Aunque estas estructuras no osificadas generalmente se continúan osificando conforme continua el desarrollo (Dodo *et al.*, 2009). Aunque en este trabajo el peso y la talla no se modificaron.

Por último, considerando la información obtenida de ambas técnicas de tinción podemos decir que la de hueso-cartílago mostró mayor número de variaciones ya que tiene mayor número de huesos con anomalías.

Dada la poca información que se tiene del efecto del  $\text{CH}_3\text{COOTI}$  sobre la reproducción y desarrollo embrionario-fetal se considera necesario realizar más estudios con el mismo compuesto administrando diferentes dosis y por periodos de tiempo diferentes, para determinar con certeza el grado de daño que puede causar este metal a los organismos durante el desarrollo intrauterino.

### *VIII. Conclusiones*

1. La administración de 4.62, 9.25 y 18.5 mg/kg de CH<sub>3</sub>COOTI en el día 7 de gestación a ratón hembras no causó toxicidad materna.
2. Los valores encontrados en toxicidad embrionaria no son estadísticamente significativos, lo que indica que el compuesto no causó toxicidad en los embriones.
3. Las principales variaciones fetales, en la anatomía externa causadas por el CH<sub>3</sub>COOTI administrado a las hembras gestantes en el día 7 de gestación son: rotación de extremidades superiores e inferiores, cola curva y de lado y tronco de lado.
4. La administración de CH<sub>3</sub>COOTI causó osificación tardía en huesos de cabeza, esternón-costilla y extremidades inferiores.
5. El uso de ambas técnicas de tinción facilitó la evaluación del sistema esquelético para identificar si los fetos presentaban huesos ausentes u osificación tardía.
6. Los resultados obtenidos muestran que el acetato de talio está provocando algunas variaciones fetales externas y en cartílago y huesos, pero se considera necesario realizar más trabajos experimentales con el mismo compuesto y modelo biológico de prueba, para determinar con certeza si el talio es un agente teratógeno.

## IX. Referencias

- ❖ Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, Mohamed Gel D, Rabah A. (2011). Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *Int J Hyg Environ Health*. 214(2):79-101.
- ❖ Altamirano-Lozano MA. (2006). Alteraciones reproductivas y del desarrollo inducidas por metales: El vanadio como ejemplo. [En: Peñaloza Pimentel E., Ortíz Muñíz R. Breña Valle M. (Eds). *Tópicos de Genética*. 237-256. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- ❖ Amaya E, Gil F, Freire C, Olmedo P, Fernández-Rodríguez M, Fernández MF, Olea N. (2013). Placental concentrations of heavy metals in a mother-child cohort. *Environ Res*. 120:63-70. Amaya E, Gil F, Freire C, Olmedo P, Fernández-Rodríguez M, Fernández MF, Olea N. (2013). Placental concentrations of heavy metals in a mother-child cohort. *Environ Res*. 120:63-70.
- ❖ Apostoli P, Catalani S. (2011). Metal ions affecting reproduction and development. *Met Ions Life Sci*. 8:263-303.
- ❖ Apostoli P, Telisman S, Sager P. (2007). Reproductive and developmental toxicity of metals. En: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press, Inc. 213-214.
- ❖ Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J, Méndez-Armenta M, Ríos C, Galván-Arzate S. (1992). Osteochondric lesions in developing rats intoxicated with thallium twenty-four hours after birth. En: EPA, US Environmental Protection Agency. (2009). Toxicological review of thallium and compounds. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System. Washington, D.C. <http://epa.gov/ncea/iris/toxreviews/1012tr.pdf>. Accessed 26 July 2013.
- ❖ Barroso-Moguel R, Méndez-Armenta M, Villeda-Hernández J, Ríos C, Galvan-Arzate S. (1996). Experimental neuromyopathy induced by thallium in rats. *J Appl Toxicol*. 16(5):385-9.

- ❖ Bolon B. (2015). Pathology of the Developing Mouse, 99-150. A systematic Approach, Taylor & Francis Group.
- ❖ Callan AC, Hinwood AL, Ramalingam M, Boyce M, Heyworth J, McCafferty P, Odland JØ. (2013). Maternal exposure to metals concentrations and predictors of exposure. *Environ Res.* 126:111-7.
- ❖ Calle TJ, Pachajoa H, Charry J, Pachecho R. (2015). Teratogenic effect of cadmium: from the developing embryo to the fetus. *Revista Colombiana De Salud Ocupacional*, 5(2), 21-26
- ❖ Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M. (2013). Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17(16):2198-2206.
- ❖ Chahoud I., Talsness C., Walter A., Grote K. (2015). Postnatal Investigation of prenatally induced effects on the vertebral column of rats reduces the uncertainty of classification of anomalies. *Reprod Toxicol.* 58:15-23.
- ❖ Del Ángel Martínez (2010). Efecto de curcumina en la teratogénesis causada por cadmio en ratón (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Secretaría de Investigación y Posgrado, México.
- ❖ Dodo T, Fukuta T, Uchida K, Mineshima H, Okuda Y, Okada F, Katsutani N, Hirano K, Aoki T. (2009). A comparative investigation of fetal skeletal anomalies in rats induced by acetylsalicylic acid with single- and double-staining techniques. *Regu I Toxicol and Pharmacol.* 54(3):308–313.
- ❖ Dos Santos AH, Ramos AC, Silveira KM, Kiss AC, Longhini R, Diniz A, de Mello JC, Gerardin DC.(2015).The exposure to Trichiliacatigua (catuaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. *J Ethnopharmacol.* 166:86-91.
- ❖ EPA, US Environmental Protection Agency. (2009). Toxicological review of thallium and compounds. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System. Whashington, D.C. <http://epa.gov/ncea/iris/toxreviews/1012tr.pdf>. Accessed 26 July 2013.

- ❖ Formigli L, Scelsi R, Poggi P, Gregotti C, Di Nucci A, Sabbioni E, Gottardi L, Manzo L, (1986).Thallium-induced testicular toxicity in the rat. *Environ Res.*40(2):531-9.
- ❖ Fort M, Cosín-Tomás M, Grimalt JO, Querol X, Casas M, Sunyer J. (2014). Assessment of exposure to trace metals in a cohort of pregnant women from an urban center by urine analysis in the first and third trimesters of pregnancy. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21(15):9234-41.
- ❖ Galanis A, Karapetsas A, Sandaltzopoulos R. (2009). Metal-induced carcinogénesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutat Res.*31; 674(1-2):31-5.
- ❖ Galván-Arzate S, Santamaría A. (1998). Mini-review: tallium toxicity. *Toxicol Lett.* 99(1):1–13.
- ❖ Gibson JE, Becker BA. (1970). Placental transfer, embryotoxicity, and teratogenicity of thallium sulfate in normal and potassium-deficient rats. En: EPA, US Environmental Protection Agency. (2009). Toxicological review of thallium and compounds. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System. Whashington, D.C. <http://epa.gov/ncea/iris/toxreviews/1012tr.pdf>.Accessed 26 July 2013.
- ❖ Gregotti C, Di Nucci A, Costa LG, Manzo L, Scelsi R, Bertè F, Faustman EM. (1992). Effects of thallium on primary cultures of testicular cells. *Journal of Toxicol Environ Health.* 36(1):59-69.
- ❖ Gregotti C, Di Nucci A, Formigli L, Sabbioni E, Manzo L. (1985). Altered testicular enzyme patterns in rats after long-term exposure to thallium sulphate. En: EPA, US Environmental Protection Agency. (2009). Toxicological review of thallium and compounds. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System. Whashington, D.C. <http://epa.gov/ncea/iris/toxreviews/1012tr.pdf>.Accessed 26 July 2013.
- ❖ Hall BK. (1977). Thallium-induced achondroplasia in chicken embryos and the concept of critical periods during development. *Teratology.*15(1):1-15.
- ❖ Hu X, Zheng T, Cheng Y, Holford T, Lin S, Leaderer B, Qiu J, Bassig BA, Shi K, Zhang Y, Niu J, Zhu Y, Li Y, Guo H, Chen Q, Zhang J, Xu S, Jin Y.(2015). Distributions of heavy metals in maternal and cord blood and the association with infant birth weight in China. *J Reprod Med.* 60(1-2):21-9



- ❖ Jain R. (2013). Effect of pregnancy on the levels of urinary metals for females aged 17-39 year sold: data from National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010, 76(2):86-97.
- ❖ Karbowska B. (2016). Presence of thallium in the environment: sources of contaminations, distribution and monitoring methods. *Environ Monit Assess* 188:640.
- ❖ Léonard A, Gerber GB. (1997) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of thallium compounds. *Mutat Res.*387(1):47-53.
- ❖ Menegola E, Broccia M, Di Renzo F, Giavini E. (2002). Comparative study of sodium valproate-induced skeletal malformations using single or double staining methods. *Reprod Toxicol.*16(6):815-23.
- ❖ Menegola E, Broccia M, Giavini E. (2001). Atlas of Rat Fetal Skeleton Double Stained for Bone and Cartilage. *Teratology* 64:125-133.
- ❖ Paniagua-Castro N. Escalona-Cardoso G. Chamorro-Cevallos G. (2007). Glycine reduces cadmium-induced teratogenic damage in mice. *Reprod Toxicol.* 23(1):92-7.
- ❖ Peter AL, Viraraghavanb T. (2005). Thallium: a review of public health and environmental concerns AL. *Environ Int.*31(4):493-501.
- ❖ Redfern BG, David Wise L, Spense S. (2007). An alternative Alcian Blue dye variant for the evaluation of fetal cartilage. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 80(3):171-6.
- ❖ Repetto G, MD, Del Peso A. (2012). Patty's Toxicology, Sixth Edition. Volume 1, Inc. Published by John Wiley & Sons, Inc.
- ❖ Rodriguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. (2013). Genetic toxicology of thallium: a review. *Drug and Chemical Toxicology.*36(3): 369–383.
- ❖ Rossi F, Marrazzo R, Berrino L, De Santis D, Lisa M, Susanna V, Montanaro C, Fici F, Marmo E. (1988). Prenatal and postnatal thallium exposure in rats: effect on development of vasomotor reactivity in pups. *Teratog Carcinog Mutagen.* 8(1):13-23.

- ❖ Rus CM., Checiu M. (2014). Teratogenic and embryo toxic effects induced by heavy metals in mice: the quest for a recent and more precise classification of fetal skeletal anomalies in mouse strains. *Vol.19, No.3*.
- ❖ Sharma R, Mogra S. (2013). Effects of gestational exposure to lead acetate on implantation and neonatal mice. *Journal of Cell and Molecular Biology* 11:47-58.
- ❖ Sirois M. (2005) *Laboratory Animal Medicine: Principles and procedures*, 87-91. Copyrigh, Mosby.
- ❖ Tiboni G., Marotta F, Del Corso A, Giampietro F. (2006). Defining critical periods for itraconazole-induced cleft palate, limb defects and axial skeletal malformations in the mouse. *Toxicol Lett.* 167(1):8-18.
- ❖ Tsai YT, Huang CC, Kuo HC, Wang HM, Shen WS, Shih TS, Chu NS. (2006). Central nervous system effects in acute thallium poisoning. *Neurotoxicology.* 27(2):291-5.
- ❖ Ungváry G, Tátrai E, Szakmáry E, Náráy M. (2001). The effect of prenatal indium chloride exposure on chondrogenic ossification. *J Toxicol Environ Health A.*62(5):387-96.
- ❖ Wei Q. (1987). Studies on spermatotoxicity of thallium carbonate in drinking water and its effect on reproductive function of mice. En: EPA, US Environmental Protection Agency. (2009). *Toxicological review of thallium and compounds*. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System. Whashington, D.C.
- ❖ Wells P, Bhuller Y, Chen C, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy J, Kim P, Laposa R, McCallum G, Nicol C, Parman T, Wiley M, Wong A.(2005) Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species, *Toxicol Appl Pharmacol.*207 (2 Suppl):354-66.
- ❖ Yu XD, Yan CH, Shen XM, Tian Y, Cao LL, Yu XG, Zhao L, Liu JX. (2011). Prenatal exposure to multiple toxic heavy metals and neonatal neurobehavioral development in Shanghai, China. *Neurotoxicol Teratol.* 33(4):437-443.

- ❖ Zheng G, Zhong H, Guo Z, Wu Z, Zhang H, Wang C, Zhou Y, Zuo Z. (2014). Levels of heavy metals and trace elements in umbilical cord blood and the risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *Biol Trace Elem Res.*160 (3):437-44.
- ❖ Ziskoven R, Achenbach C, Schulten HR, Roll R. Thallium determinations in fetal tissues and maternal brain and kidney. *Toxicol Lett.* 19(3):225-31.